

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Dominik Smrž

ANALÝZA CHLADICÍCH KAPALIN POMOCÍ UHPLC

Determination of Engine Coolant by UHPLC

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Anna Kubičková, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 19. května 2017.

Abstrakt

V současnosti neexistuje normovaná metoda na stanovení organických inhibitorů koroze v chladicích kapalinách. Tato práce se proto zabývá vývojem rychlé a účinné metody pro jejich stanovení metodou UHPLC ve všech komerčně dostupných chladicích kapalinách. Byla vyvinuta a optimalizována metoda s následujícími separačními podmínkami: kolona s částicemi s tuhým jádrem Poroshell 120 SB-AQ, eluční gradient směsi methanolu a vodného roztoku 0,05% kyseliny trifluoroctové od 40 do 65 % (v/v) methanolu, dávkovaný objem byl 1 μ l, detekce při vlnové délce 211 nm, vše při teplotě 25 °C. Celková doba analýzy činila 6,5 minuty. Kalibrační závislosti byly měřeny v rozsahu koncentrací od 0,25 do 4,0 g l⁻¹ pro kyseliny 2-ethylhexanovou, 3,5,5-trimethylhexanovou, nonanovou a dekandiovou, v rozsahu 0,025-0,400 g l⁻¹ pro imidazol, benzotriazol, methylbenzotriazol, benzothiazol-2-thiol a kyselinu benzoovou. Pro tyto vybrané inhibitory koroze byl LOQ nižší než 280 mg l⁻¹ a LOD nižší než 90 mg l⁻¹. Zvolené kalibrační úrovně zcela ležely v lineárním dynamickém rozsahu detektoru.

Klíčová slova

chladicí kapaliny, organické kyseliny, aryltriazoly, UHPLC, Core–Shell kolony

Abstract

Nowadays, there is no standard method for determination of organic corrosion inhibitors in engine coolant. Due to that the aim of this bachelor thesis is to develop a rapid and effective method for their determination by UHPLC method in all commercially available engine coolants. The method was developed and optimized. The optimal separation conditions are: core-shell column Poroshell 120 SB-AQ, gradient elution programme of methanol and 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid solution mixture (concentration of methanol changes from 40 to 65 % (v/v)), dosed volume 1 μ l, detection at wavelength 211 nm. All analyzes were performed at 25 °C. The analysis duration is 6.5 min. Calibration dependences were measured from 0.25 to 4.0 g l⁻¹ for 2-ethylhexanoic, 3,5,5-trimethylhexanoic, nonanoic and decanoic acid, in range 0.025 - 0.400 g l⁻¹ for imidazole, benzotriazole, methylbenzotriazole, benzothiazole-2-thiol and benzoic acid. The calibration curves are linear in whole range of detector for all chosen corrosion inhibitors.

Key words

engine coolants, organic acids, aryltriazoles, UHPLC, Core-Shell columns

Poděkování

Rád bych zde poděkoval své vedoucí bakalářské práce RNDr. Anně Kubíčkové, Ph. D. za její cenné rady, připomínky, čas, trpělivost a ochotu, které mi byly věnovány při vypracování této práce.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1. <i>Chladicí kapaliny</i>	10
2.1.1. Popis a použití	10
2.1.2. Historie složení	10
2.2. <i>Organické inhibitory koroze</i>	12
2.2.1. Struktura a fyzikální vlastnosti	12
2.2.2. Metody používané pro stanovení.....	13
2.3. <i>Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie</i>	15
2.3.1. Instrumentální provedení	16
2.3.2. Core-Shell kolony.....	18
3. Cíl práce	19
4. Experimentální část.....	20
4.1. <i>Použité chemikálie a přístroje</i>	20
4.1.1. Chemikálie.....	20
4.1.2. Instrumentace.....	20
4.2. <i>Příprava standardních roztoků a vzorků</i>	21
4.2.1. Standardní roztoky.....	21
4.2.2. Vzorky chladicích kapalin	22
4.3. <i>Příprava kalibračních roztoků</i>	22
4.4. <i>Separační podmínky</i>	22
4.5. <i>Analytické zhodnocení metody</i>	23
4.5.1. Určení meze stanovitelnosti a meze detekce	23
4.5.2. Lineární dynamický rozsah	23
4.5.3. Opakovatelnost	23
4.5.4. Stanovení výtěžnosti metody.....	24
5. Výsledky a diskuze	25
5.1. <i>Optimalizace složení mobilní fáze a výběr kolony</i>	25
5.2. <i>Kalibrační závislosti</i>	29
5.3. <i>Vyhodnocení analytických parametrů</i>	32
5.3.1. Stanovení meze stanovitelnosti a meze detekce	32
5.3.2. Lineární dynamický rozsah	32
5.3.3. Opakovatelnost	33
5.3.4. Stanovení výtěžnosti metody.....	34

5.4. <i>Aplikace metody na analýzu reálných chladicích kapalin</i>	35
6. Závěr	38
7. Použitá literatura	39

Seznam zkratk a symbolů

2EHA	kyselina 2-ethylhexanová
ASTM	americká společnost pro testování a materiály
BA	kyselina benzoová
BTA	1H-benzotriazol
DAD	detektor s diodovým polem
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IM	imidazol
INA	kyselina 3,5,5-trimethylhexanová
MBT	benzothiazol-2-thiol
MEG	ethan-1,2-diol
MPG	propan-1,2-diol
MS	hmotnostní detektor
OAT	technologie organických kyselin
PA	kyselina nonanová
PEEK	polyetheretherketon
SA	kyselina dekandiová
SiOAT	technologie organických kyselin v kombinaci s křemičitany
TFA	Kyselina trifluoroctová
TTA	methyl-1H-benzotriazol
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
v/v	objemový poměr
vis	viditelná část spektra
w/w	hmotnostní poměr

1. Úvod

Organické inhibitory koroze jsou v současnosti nejvíce zastoupenými inhibitory koroze v chladicích kapalinách. Nicméně pro jejich stanovení dosud neexistuje normovaný postup. Znalost přesného složení chladicí kapaliny je velice důležitá pro posouzení její antikorozní ochrany bez nutnosti provádění zdlouhavých korozních testů, které trvají nejméně dva týdny.

Na základě chemické povahy těchto sloučenin byla k analýze vybrána metoda kapalinové chromatografie s UV detekcí. Tato metoda je obzvláště výhodná, jelikož i přes komplexní charakter nemrznoucích směsí není nutná žádná složitá předúprava vzorků ve smyslu derivatizace jednotlivých látek a pro vlastní analýzu stačí vzorek chladicí kapaliny pouze naředit vhodným rozpouštědlem.

2. Teoretická část

2.1. Chladicí kapaliny

2.1.1. Popis a použití

Chladicí kapaliny se obecně používají k zajištění efektivního přenosu tepla, a to jak při chlazení, tak při vytápění. Nejčastějšími aplikacemi jsou: chlazení spalovacích motorů vozidel, přenos tepla v budovách, přenos chladu v mrazírnách a jiných systémech, kde je nutné zabezpečit výměnu tepla při teplotách pod bodem tuhnutí, popřípadě nad bodem varu, vody. Použitím nemrznoucích směsí, jak se někdy označují chladicí kapaliny, musí dojít k ochraně systému před zamrznutím, varem a korozí, tak aby použitá směs bezproblémově přenášela teplo a nemohlo dojít k ucpání systému, či dokonce jeho poničení.

Chladicí kapaliny jsou nejčastěji vodné roztoky ethan-1,2-diolu (monoethylenglykol; MEG), propan-1,2-diolu (monopropylenglykol; MPG) nebo propan-1,2,3-triolu (glycerol). Díky použití vodných roztoků výše zmíněných alkoholů mají chladicí kapaliny, oproti vodě, snížený bod tuhnutí a mírně zvýšený bod varu. Souhrnně se tedy zvyšuje rozsah teplot, ve kterých je zaručena jejich primární funkce – chlazení. Další nezbytnou složkou jsou inhibitory koroze, které zabráňují korozi kovů, jež jsou použity jako konstrukční prvky systémů, ve kterých chladicí kapaliny kolují. Kapaliny také obsahují další přísady, mezi něž patří odpěňovadla, barviva a látka zabráňující požití (benzoan denatonium; Bitrex®). Chladicí kapaliny se vyrábějí zpravidla s obsahem vody do 5 % (w/w), pro vlastní aplikaci se ředí vodu v koncentracích od 20 do 60 % (v/v).

2.1.2. Historie složení

S rozvojem v automobilovém průmyslu byl postupně kladen větší důraz na chlazení motoru a tím i na chladicí kapaliny samotné.

V počátcích automobilového průmyslu, kdy bylo nutné chladit motor pouze v létě, sloužila jako náplň chladicího systému pouze voda. Ta se koncem léta vypustila. Se stále zvyšujícími se požadavky na zimní provoz, začátkem 20. století, se začali přidávat přísady bránící zamrznutí (MEG, glycerol, cukr, líh aj.), po zimě se směs opět vyměnily za vodu. Pro celoroční provoz se používal motorový olej. Nároky na chladicí kapalinu nebyly příliš vysoké, a proto se inhibitory koroze používali jen velice zřídka a spíše jako doplněk směsi než jako její podstatná součást. S vzestupem automobilového průmyslu po druhé světové válce, byl vývoj chladicích kapalin nejen mnohem intenzivnější, ale také došlo k vytvoření prvních standardů, které se zabývali chladicími kapalinami. Komise D15 pro chladicí kapaliny a související kapaliny byla založena roku 1947. Do současnosti ustanovila přes 39 norem ASTM International [1]. Ty se zabývají jak složením chladicích kapalin, tak jejich parametry a v neposlední řadě i metodami jakými má být složení a deklarované veličiny měřeny.

Vznik standardů ucelil složení chladicích kapalin. Nejprve byl kladen důraz na použité látky snižující bod tuhnutí. Zde se začal plošně používat MEG, který je jednou z nejdůležitějších surovin pro výrobu chladicích směsí dodnes. Koncem 20. století se jako jeho netoxická obdoba začal používat MPG. V současnosti je kladen důraz na ekologii používaných surovin, a proto se MEG částečně nahrazuje glycerolem.

Používání alkoholových roztoků umožnilo celoroční a zároveň i víceletý provoz nemrzoucích směsí. To vedlo k nutnosti používat důmyslnější systém inhibitorů koroze. Po zavedení standardů se používaly převážně anorganické inhibitory koroze: tetraboritany, dusitany, dusičnany, křemičitany, fosforečnany, molybdenany, chromany a uhličitan. Vzhledem ke své krátké životnosti, jež si žádá výměnu směsi maximálně po třech letech, byly anorganické inhibitory postupně nahrazeny organickými jako jsou: aminy (převážně diethanolamin a triethanolamin), benzotriazol (BTA), methylbenzotriazol (tolyltriazol; TTA), imidazol (IM), benzothiazol-2-thiol (merkaptobenzothiazol; MBT), aromatické a alifatické mono a dikarboxylové kyseliny.

Přechod mezi anorganickými a organickými inhibitory byl postupný. Nejstarším inhibiční technologií je kombinace vhodně vybraných anorganických inhibitorů koroze často doplněných o BTA, TTA a aminy. Dále následovala tzv. HOAT (hybrid organic acid technology), jež kombinuje organické kyseliny, BTA a TTA s tetraboritany a křemičitany. V současnosti nejvíce používaná je OAT (organic acid technology),

která využívá pouze organických inhibitorů, čímž došlo k prodloužení výměnné lhůty chladicích kapalin až na pět let. Nejnovější technologií je Si-OAT (silicate and organic acid technology), která kombinuje OAT společně s křemičitany.

2.2. Organické inhibitory koroze

V současné době se pro výrobu nemrznoucích směsí používají všechny výše zmíněné organické inhibitory s výjimkou aminů, které při vyšších teplotách reagují s používanými dusitany za vzniku nitrosaminů. Z tohoto důvodu bylo od jejich používání upuštěno. Z organických kyselin se nejčastěji používají kyseliny s počtem uhlíků 6 až 12. Nicméně s ohledem na dostupnost a cenu surovin patří mezi nejpoužívanější kyseliny: 2-ethylhexanová (2EHA), dekandiová (sebaková; SA), 3,5,5-trimethylhexanová (isononanová; INA), nonanová (pelargonová; PA) a benzoová (BA).

Pro zajištění správné antikorozní ochrany je nutné dodržet rozmezí pH vodného roztoku chladicí kapaliny mezi hodnotami 7,5 až 9,0. Při výrobě se proto použité organické sloučeniny neutralizují hydroxidem sodným nebo draselným, a to zcela či částečně v závislosti na disociační konstantě dané látky a výsledného pH. Částečně neutralizované sloučeniny pak plní mimo jiné i funkci pufrů a nahrazují tak pufrы anorganické mezi něž patří například borax či fosforečnany.

2.2.1. Struktura a fyzikální vlastnosti

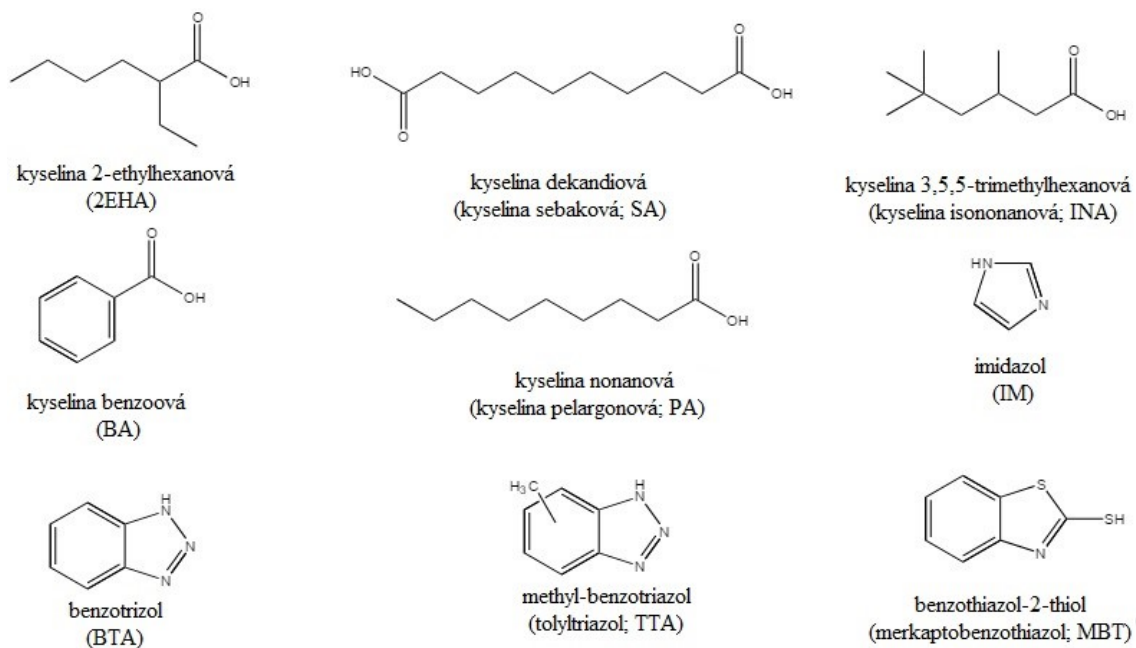
Pro organické inhibitory je důležité, aby byly rozpustné v glykolech, a to v koncentracích minimálně do 5 % (w/w). Jsou-li špatně rozpustné v podobě volných kyselin musí být rozpustná alespoň jejich sodná či draselná sůl. Z tohoto důvodu obsahují všechny používané látky nejméně jednu polární skupinu, která může podléhat deprotonizaci v závislosti na pK_A sloučenin.

V tabulce 2.1 jsou shrnuty záhlavní fyzikální veličiny devíti nejčastěji používaných látek. Na obrázku 2.1. jsou poté znázorněny jejich struktury. Těchto devět vybraných inhibitorů koroze bylo předmětem vývoje vhodné analytické metody.

Tabulka 2.1: Fyzikální parametry sloučenin; M_r je relativní molární hmotnost a $t_{\text{var.}}$ je teplota varu ve °C.

Sloučenina	pK_A [2]	M_r	$t_{\text{var.}} / ^\circ\text{C}$ [2] [3]
2EHA	4,8	144	228
BA	4,2	122	249
BTA	8,2	119	350
IM	7,0 ¹	68	256
INA	4,9	158	236
MBT	7,0	167	–
PA	5,0	158	254
SA	4,7; 5,5	202	294
TTA	8,7	133	361

¹ hodnota pro konjugovanou kyselinu



Obrázek 2.1: Struktura vybraných organických inhibitorů kůže

2.2.2. Metody používané pro stanovení

Na základě fyzikálně-chemických vlastností devíti vybraných látek, lze jako nejvhodnější metodu pro jejich stanovení zvolit jednu z chromatografických separačních

metod. Pro stanovení samotných organických kyselin se často používá plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), nebo s plamenově ionizační detekcí (GC-FID). Vzhledem k vysokému bodu varu analytů je vhodné nestanovovat analyty přímo, nýbrž jejich deriváty, a to buď estery s ethanolem nebo silanolované [3-4]. Také je lze stanovit přímo pomocí HPLC-ELSD [5]. Za využití HPLC-MS se organické kyseliny stanovují v séru, plazmě a moči [6]. Nižší mastné kyseliny, často jejich hydroxy deriváty, se touto technikou stanovují například v potravinách [7]. Při použití HPLC není nutná derivatizace vzorku, na rozdíl od GC, kde se musí analyty převést na těkavější derivát.

BTA a TTA jsou jako dobré inhibitory koroze mědi často užívané v kotelních vodách a v kapalinách sloužících pro rozmrazování letadel. Proto se staly předmětem analýz půdy a vod v okolí letišť a měst. Studie, zabývající se koncentrací těchto dvou látek podél velkých německých řek ústících do Severního moře, používala pro stanovení nejprve koncentrování na tuhé fázi. Vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC-MS/MS [8]. Stejnou instrumentální technikou byly analyzovány i vzorky půd v okolí letišť. Z matrice byly analyty extrahovány do 50% roztoku acetonitrilu ve vodě a následně přečištěny filtrací [9].

Analýzu karboxylových kyselin společně s dusíkatými heterocykly v chladicích kapalinách uvádí společnost Thermo Scientific ve svých materiálech. Pro stanovení látek byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí v úpravě diodového pole, HPLC-DAD. Tím mohlo dojít k detekci při více vlnových délkách najednou. Výsledná analýza byla prováděna v kyselém fosforečnanovém pufru při pH 3,07 a acetonitrilu gradientovou elucí. Vedle organických inhibitorů koroze byla sledována přítomnost kyseliny 2-hydroxyethanové, která je jedním z oxidačních produktů ethan-1,2-diolu. Metoda se prokázala být účinná jak pro zvolené matrice, tak pro vybrané analyty. Jako adekvátní vlnová délka pro detekci všech sloučenin byla vybrána hodnota 210 nm [10]. Nevýhodou vyvinuté metody, je použití málo běžné iontoměničové kolony Acclaim Mixed-Mode WAX-1 4,6 x 150 mm (5 µm). Tato stacionární fáze je nezbytná pro stanovení kyseliny glykolové. Jelikož tato kyselina není inhibitorem koroze, lze pro stanovení ostatních analytů použít i jiné kolony se stacionární fází C18, jejichž použití zaručuje mnohem větší robustnost metody.

S ohledem na publikované práce v oblasti HPLC a vlastnosti látek se jako vhodná metoda pro jejich stanovení jeví i ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC. Metody stanovení pomocí UHPLC nebyly doposud publikovány. V tabulce 2.2 je shrnuto složení mobilních fází, kolony a způsoby detekce u publikovaných metod, které jsou určené ke stanovení inhibitorů koroze nebo látek jim podobných.

Tabulka 2.2: Příklady stanovení vybraných látek nebo jim podobných metodou HPLC

Analyt	Mobilní fáze	Kolona	Detekce
Kyselina nonandiová [5]	methanol/voda s 1,5 % CH ₃ COOH ¹	Purospher Star RP, C18 250 x 4 mm (5 µm)	MS/MS
Dikarboxylové kyseliny C2-C10 [6]	85/15 v/v methanol/5 mM HCOONH ₄	Luna, C18 30 x 3 mm (3 µm)	MS/MS
Organické kyseliny [7]	acetonitril/methanol/voda (30/20/50 v/v/v)	C8 a C18	vis
BTA a TTA [8]	methanol/voda s 1% HCOOH ¹	Phenomenex Synergy Hydro RP 80A	MS/MS
BTA a TTA [9]	acetonitril/voda ¹	Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 x 150 mm (5 µm)	MS/MS
Organické inhibitory koroze [10]	acetonitril/ 100 mM KH ₂ PO ₄ a H ₃ PO ₄ ¹	Acclaim Mixed-Mode WAX-1 4,6 x 150 mm (5 µm)	DAD

¹ gradientový eluce

2.3. Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC, je relativně novou metodou v chromatografii. Jejím základním rozdílem od HPLC je používání částic menších než 2 µm a tím i vyšších tlaků v řádech až 10⁸ Pa. Metoda obecně dosahuje lepší

separační účinnosti, spotřebovává menší množství rozpouštědel a vyžaduje menší množství dávkovaného vzorku. To vše obecně snižuje celkové náklady na analýzu. [11].

UHPLC v kombinaci s kolonami, jenž obsahují částice s tuhým jádrem tzv. Core-Shell nebo Solid-Shell dosahují velmi vysokých účinností při nízké spotřebě rozpouštědel, vzorků, a navíc v mnohem kratší době analýzy než u HPLC.

2.3.1. Instrumentální provedení

Instrumentace UHPLC zůstává stejná jako v případě HPLC, pouze dochází k vylepšení jednotlivých částí. Důležitým požadavkem na jednotlivé části je odolnost vůči vysokým tlakům. Ten zajišťují vysoce účinné pumpy. Tlak před kolonou dosahuje hodnot až 10^8 Pa. Tomu musí být přizpůsobeny spojovací materiály a kapiláry, které nejčastěji sestávají z ocele, pozlacené ocele, kombinací ocele a polyetheretherketonu (PEEK), či vysoce odolného PEEK zapouzdrěného v niklu použitelného až do $2,5 \cdot 10^8$ Pa. Velký důraz je také kladen na zmenšení mrtvých objemů. [12]

Vlastní separace látek je prováděna na kolonách, které jsou plněny částicemi o průměru menším než $2 \mu\text{m}$. Maximální průtoková rychlost je 5 ml min^{-1} . Díky možnosti používat menší částice se významně zvýšila účinnost separace jež je dána vztahem:

$$N = \frac{L}{H}, \quad (2.1.)$$

kde N je účinnost separace, L je délka kolony a H je výškový ekvivalent teoretického patra [11]. H je poté popsán van Deemterovou rovnicí:

$$H = A d_p + \frac{B}{u} + C d_p^2 u, \quad (2.2.)$$

kde A , B a C jsou koeficienty van Deemterovy rovnice, u je lineární rychlost a d_p je průměr částic [11].

Z rovnic (2.1.) a (2.2.) je tedy patrné tvrzení, že se snižujícím se průměrem částic sorbentu se zvyšuje u stejně dlouhé kolony účinnost separace. S nižším průměrem částic však dochází ke zvýšení tlaku. Ten se mění dle vztahu:

$$\Delta p = 4000 \frac{F_m \eta L}{\pi d_c^2 d_p^2}, \quad (2.3.)$$

kde Δp je tlak, F_m je průtok mobilní fáze, η je viskozitní koeficient mobilní fáze, L je délka kolony, d_c průměr kolony a d_p průměr částic [11]. Proto se v UHPLC často využívají kolony kratší než v HPLC. Ty mají sice dle rovnice (2.1.) nižší separační účinnost, separační účinnost vztažená na jednotku délky kolony je však vyšší než u HPLC kolon. Kratší kolony pak dovolují provádět mnohem rychlejší analýzy. Navíc je díky menšímu průměru částic průběh van Deemterovy funkce mnohem plošší a hodnota výškového ekvivalentu teoretického patra příliš neroste se zvyšující se lineární rychlostí.

Jak již bylo řečeno, kolony jsou kratší než v případě HPLC zpravidla kolem 5 až 10 cm a s průměrem nejčastěji 2,1 mm nebo 1 mm. Stacionární fáze se používají stejné jako v případě HPLC: C8, C18, s navázanými polárními skupinami (karbamáty, fenoly) aj. A stejně jako u stacionárních fází jsou používány i stejné sorbenty: silikagel, polymerní sorbenty atd. Velký význam mají kolony označované jako HPT (hybrid particle technology), u kterých se pomocí methylenových můstků mezi molekulami stacionární fáze podařilo dosáhnout obzvláště vysoké mechanické odolnosti, vysoké separační účinnosti, a to v širokém rozmezí pH. Ještě více pokročilé jsou kolony BEH (ethylene bridged hybrid). Jedná se o druhou generaci hybridní technologie, jež se vyznačuje ještě lepší mechanickou odolností a použitelností v rozsahu pH 1 až 12.

K detekci analytů se využívá obvyklých detektorů známých z HPLC, včetně MS a více dimenzionální MS.

Vzhledem k obecně menšímu průměru kapilár a kolon je také kladen důraz na čistotu chemikálií a vzorků. Zde je třeba dbát na pečlivé filtrování vzorků před vlastní analýzou, aby nedošlo k ucpání chromatografického systému.

2.3.2. Core-Shell kolony

Posledním typem kolon, které sice byly již používány i v instrumentacích HPLC, jsou kolony s pevným jádrem zvané Core Shell popřípadě Solid Shell. Jedná se o kolony, jež jsou vyplněny pevnými kulovitými částicemi sorbentu, na niž je nanášena tenká vrstva stacionární fáze. Díky tomu dochází ke snížení tlaku systému ve srovnání se stejně velkými obyčejnými částicemi, navíc je snížena difúze během analýzy [11-14].

Rozdíl mezi částicemi s tuhým jádrem a klasickými takzvaně plně propustnými (fully porous columns) je v uspořádání sorbentu. U kolon s plně propustnými částicemi je jejich tělo vyplněné sorbentem, nejčastěji silikagelem nebo organickým polymerem, na něž je navázána stacionární fáze. Ta má definovanou tloušťku, jež je udána výrobcem. Částice sorbentu však mají širší distribuci poloměrů, oproti Core-Shell kolonám, a jsou pro mobilní fázi zcela propustné. Kolony s částicemi s tuhým jádrem jsou oproti předešlému typu plněny sorbentem tvořeným dokonale kulovitými částicemi, ty mají definovaný poloměr a jsou v tomto parametru navíc velice jednotné. Na ně je stejně jako v předešlém případě navázána stacionární fáze o definované síle. Tuhé jádro částice se separace neúčastní a potřebné interakce probíhají pouze na povrchu této koule – se stacionární fází. Díky tomu může být vrstva stacionární fáze mnohem tenčí, zatímco samotné částice jsou stále poměrně velké. Tím není dosaženo takových tlaků při analýze a zároveň je průběh van Deemterovy funkce mnohem méně závislý na lineární rychlosti. Tím lze provádět rychlé analýzy i za použití menších tlaků. Další výhodou Core Shell kolon je v lepší separační účinnosti, ta je obecně lepší u 5 μm částic s tuhým jádrem než u plně propustných. A to až o 90 %. Nicméně u částic s průměrem 1,7 μm je zlepšení o pouhých 20 %. Kolony s nejmenšími částicemi jsou použitelné pouze v instrumentaci UHPLC, jelikož i přes obecně menší tlakovou náročnost Core-Shell kolon, je potřebný tlak na provedení analýzy nad rámec HPLC [15].

Core Shell kolony nacházejí využití vedle HPLC a UHPLC, také v chromatografii preparativní, hydrofilní interakční chromatografii (HILIC HPLC), kapilární elektrochromatografii a také ve dvou dimensionální kapalinové chromatografii [16].

3. Cíl práce

Cílem této práce je vyvinout vhodnou metodu pro stanovení vybraných organických inhibitorů koroze. Metoda by měla být co nejrychlejší a nejúčinnější, zároveň by neměla být nikterak nákladná z ekonomického hlediska. Navržená metoda by měla být vhodná pro analýzu všech komerčně dostupných chladicích kapalin na bázi dvojsytných a trojsytných alkoholů tak, aby mohla být v relativně krátkém čase posouzena jejich kvalita a nemusely být prováděny zdlouhavé korozní testy.

Pro vývoj této metody by mělo být využito nejnovějších poznatků analytické chemie, a proto byla navržena separace pomocí UHPLC na kolonách obsahujících sorbent s tuhým jádrem (Core-Shell).

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie a přístroje

4.1.1. Chemikálie

- benzothiazol-2-thiol, benzotriazol, methyl-benzotriazol (čistota ≥ 98 %, Technoservis MT, Česká republika)
- imidazol (čistota ≥ 99 %, Alfa Accer, Německo)
- kyselin trifluoroctová (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma – Aldrich, Německo)
- kyseliny 2-ethylhexanová, 3,3,5-trimethylhexanová, nonanová (čistota $\geq 99,2$ %, Oxea, Švédsko)
- kyselina benzoová (čistota $\geq 99,5$ %, Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina sebaková (čistota $\geq 99,5$ %, Arkema, Francie)
- methanol (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma – Aldrich, Německo) v čistotě pro HPLC
- dusičnan sodný (čistota $\geq 99,8$ %, Euro Šarm, Česká republika)
- borax (čistota ≥ 98 %, Fichema, Česká republika)
- křemičitan sodný (čistota ≥ 98 %, Vodní sklo, Česká republika)

4.1.2. Instrumentace

- kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1200 Infinity s detektorem diodového pole Agilent 1200 Infinity Diode Array Detector VL (G1315D), (Agilent Technologies, USA)
- kapalinová chromatograf Waters Acquity UPLC H Class (Water, USA)
- kolona Poroshell HPH-C18 ($3,0 \times 100$ mm, velikost částic $2,7 \mu\text{m}$), (Agilent Technologies, USA)
- kolona Poroshell 120 SB-AQ ($2,1 \times 100$ mm, velikost částic $2,7 \mu\text{m}$) a předkolony o délce 5 mm se stejným průměrem a velikostí částic, (Agilent Technologies, USA)

- analytické váhy Ohaus PA114C (Ohaus Corporation, USA)
- pH metr Jenway 4330 (Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (Metrohm, Německo)

4.2. Příprava standardních roztoků a vzorků

4.2.1. Standardní roztoky

Analyzované látky jsou jak kapalinami (2EHA, INA, PA), tak pevnými látkami (TTA, BTA, MBT, BA, SA, IM) a všechny jsou alespoň částečně rozpustné v ethan-1,2-diolu, proto byl jako nejvhodnější rozpouštědlo zvolen methanol. Ten byl použit nejen pro rozpouštění čistých standardů, ale také vzorků chladicích kapalin.

Bez ohledu na skupenství byly všechny standardy nejprve naředěny a byly tak připraveny jejich zásobní roztoky. Pro účely ředění byly analyty váženy s přesností na 0,1 mg. Koncentrace zásobních roztoků jsou zachyceny v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Koncentrace, c , zásobních roztoků

Analyt	$c / \text{g l}^{-1}$
2EHA	10,0
INA	10,0
PA	10,0
SA	10,0
TTA	1,00
BTA	1,00
MBT	1,00
imidazol	1,00

Tyto zásobní roztoky byly použity pro přípravu ředěných roztoků pro vývoj a optimalizaci podmínek metody.

4.2.2. Vzorky chladicích kapalin

Vzorky chladicích kapalin byly taktéž ředěny methanolem. Pro zajištění přesné koncentrace byly odvažovány do 25ml odměrných baněk. Hmotnost vzorků byla volena 1,25 g, aby výsledná koncentrace činila 50 g l^{-1} .

4.3. Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky pro kvantifikaci metody byly připravovány v pěti úrovních postupným ředěním nejkoncentrovanějšího. Příprava nejkoncentrovanějšího spočívala v odvážení jednotlivých analytů a rozpuštěním v odpovídajícím množství methanolu. Každá další úroveň měla poloviční koncentraci. Aby bylo zamezeno nedostatečné separaci k základní linii u nejvyšších koncentrací, byla kalibrace prováděna ve dvou sadách. V první byly tyto analyty: IM, BA, MBT, 2EHA, PA, v druhé pak: BTA, TTA, SA a INA. Koncentrace pro kalibraci byly voleny s ohledem na reálné složení chladicích směsí a to následovně. Pro 2EHA, INA, PA, SA od 0,25 do $4,00 \text{ g l}^{-1}$ a pro BA, IM, BTA, TTA a MBT od 0,025 do $0,400 \text{ g l}^{-1}$.

4.4. Separační podmínky

Dávkovaný objem vzorků byl zvolen $1 \mu\text{l}$.

Průtok mobilní fáze byl pro kolonu Poroshell HPH-C18 $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, při isokratické eluci a $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ při gradientové. Tlak v koloně dosahoval v obou případech hodnot kolem 600 bar. V koloně Poroshell 120 SB-AQ byl pak volen průtok $0,35 \text{ ml min}^{-1}$, zde se tlak pohyboval také kolem 600 bar.

Mobilní fáze nejprve sestávala z methanolu a vody. Poměr složek se v průběhu gradientového programu měnil od 10 do 90 % (v/v) methanolu. Nakonec byla mobilní fáze optimalizována a voda byla nahrazena roztokem 0,05% (v/v) kyseliny trifluoroctové (TFA), zde se koncentrace methanolu měnila od 40 do 65 % (v/v) methanolu

Detekce byla prováděna pomocí detektoru s diodovým polem. Pro detekci byla zvolena vlnová délka $\lambda = 211 \text{ nm}$.

4.5. Analytické zhodnocení metody

4.5.1. Určení meze stanovitelnosti a meze detekce

Mez stanovitelnosti, LOQ , a mez stanovitelnosti, LOD , jednotlivých látek byly spočteny dle následujících rovnic:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{s_b}{a} \quad (4.1),$$

$$LOD = 3 \cdot \frac{s_b}{a} \quad (4.2),$$

kde a je směrnice příslušné kalibrační přímky v $g\ l^{-1}\ AU^{-1}\ s^{-1}$, s_b je směrodatná odchylka úseku na ose y . [17]

4.5.2. Lineární dynamický rozsah

Lineární dynamický rozsah byl ověřen vynesemím logaritmických hodnot signálu proti logaritmickým hodnotám příslušných koncentrací. Těmito body byla proložena regresní přímka. Na základě jejího korelačního koeficientu bylo rozhodnuto, zdali je v daném rozsahu koncentrací odezva detektoru lineární.

4.5.3. Opakovatelnost

Opakovatelnost konečné metody byla ověřena 10 po sobě jdoucími měřeními jednoho referenčního vzorku, který obsahoval BTA, TTA, INA, SA. Úspěšnost opakovatelnosti pak byla hodnocena pomocí směrodatné odchylky s , viz rovnice (4.4) a její relativní hodnoty s_r , viz rovnice (4.5).

$$s = k_n R \quad (4.4),$$

kde k_n je tabelovaný koeficient pro n měření a R je rozpětí, jež je definováno jako rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou signálu.

$$s_r = \frac{s}{\bar{S}} \quad (4.5),$$

kde \bar{S} je průměr hodnot signálů při n měřeních.

4.5.4. Stanovení výtěžnosti metody

Pro stanovení výtěžnosti metody, R_f , byly připraveny roztoky představující reálné chladicí kapaliny o známém složení. Tyto vzorky byly následně naředěny na koncentraci 50 g l^{-1} methanolem a stanoveny optimalizovanou metodou. Získané hodnoty koncentrací, c_{obs} , byly poté použity pro výpočet výtěžnosti dle vztahu:

$$R_f = \frac{c_{\text{obs}}}{c_{\text{ref}}} \quad (4.6),$$

kde c_{ref} je referenční hodnota koncentrace v daném vzorku.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Optimalizace složení mobilní fáze a výběr kolony

Na základě provedené literární rešerše byla nejprve vybrána kolona se stacionární fází C18 vázanou na částicích s tuhým jádrem Poroshell HPH-C18. Rozměry kolony jsou $3,0 \times 100$ mm, průměr částic je $2,7 \mu\text{m}$. Kolona je použitelná v rozsahu pH od 3 do 11. S touto kolonou byly prováděny separace na přístroji Agilent Technologies 1260 Infinity. S ohledem na rozsah použitelnosti kolony byla jako mobilní fáze zvolena směs methanolu a vody.

Všechny analyty byly nejprve zředěny na desetinu koncentrace zásobních roztoků a následně analyzovány při různých poměrech methanolu a vody. Při těchto analýzách byly pozorovány hodnoty retenčních časů a účinnost separace jednotlivých analytů. Hodnoty retenčních časů při různém složení mobilní fáze jsou shrnuty v tabulce 5.1.

Tabulka 5.1: Hodnoty retenčních časů v minutách při různých poměrech methanolu a vody. Separační podmínky: průtok $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, detekce při 211 nm, dávkovaný objem $1 \mu\text{l}$.

Analyt / methanol:voda	60:40	65:35	75:25	85:15	90:10
2EHA	+	2,858	1,648	1,168*	1,048
INA	+	3,751	1,917	1,249	1,092
PA	+	5,558	2,450	1,417	1,183
TTA	1,285	1,154	1,004	-	-
BTA	1,065	1,008	0,933	-	-
SA	1,862	1,475	1,087*	0,935	0,895
imidazol	0,900	0,889	0,872	-	-

* interference se systémovým píkem,

- neměřeno kvůli nedokonalé separaci,

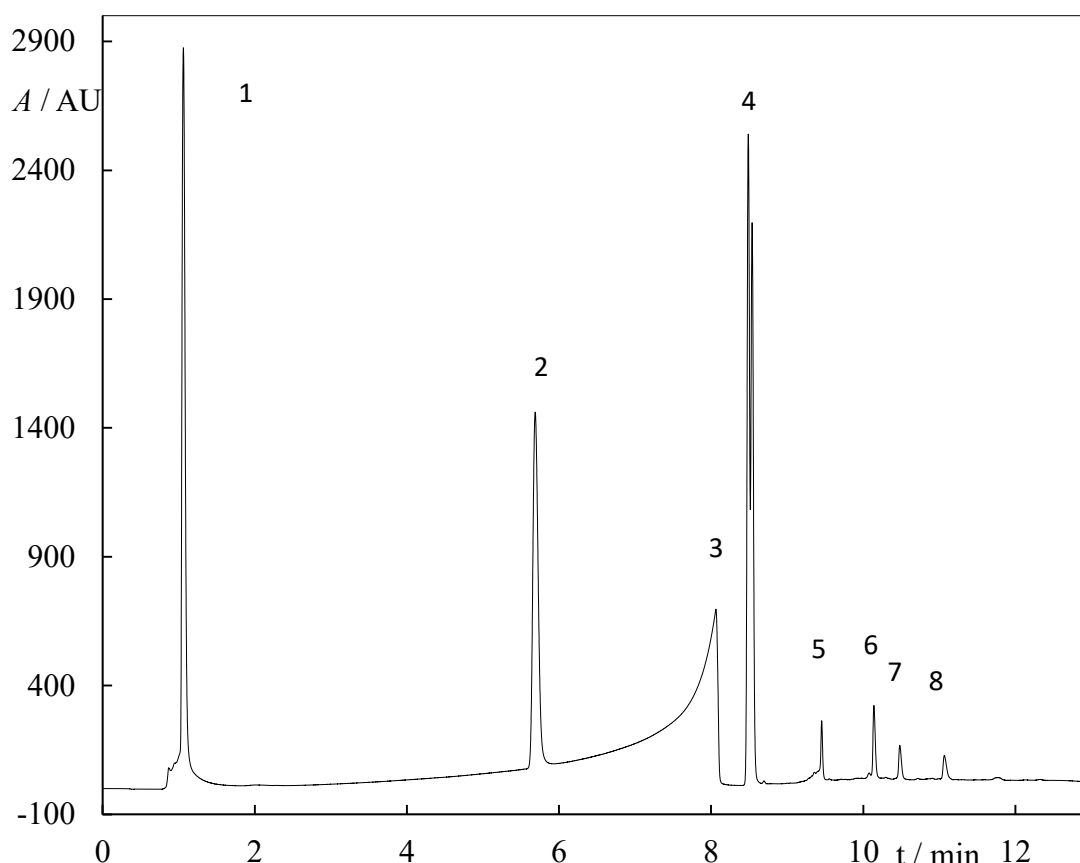
+ neměřeno pro špatný profil píku

Z hodnot retenčních časů je patrné, že pro analýzu všech látek v jedné metodě není isokratická eluce vhodná. Jelikož při vyšších koncentracích nejsou první analyty řádně separované, naopak při nízkých koncentracích methanolu jsou retenční časy příliš dlouhé a dochází k rozmývání posledních píků. Řešením tohoto problému je použití gradientové eluce, kdy navíc dojde ke zkrácení celkové délky analýzy.

Postupně byl gradientový program optimalizován a to tak, aby bylo docíleno co nejlepší separovatelnosti, a i co nejvyššího využití píkové kapacity metody. Výsledkem je gradientový program uvedený v tabulce 5.2. Tímto gradientovým programem byla analyzována směs analytů s koncentracemi 10 g l⁻¹ (2EHA, INA, PA, SA) a 0,1 g l⁻¹ (BA, BTA, TTA, IM). Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 5.1.

Tabulka 5.2: Optimalizovaný gradientový program

t / min	$\varphi(\text{voda})$	$\varphi(\text{methanol})$
0	90 %	10 %
6	70 %	30 %
8	25 %	75 %
11	25 %	75 %
13	90 %	10 %



Obr.5.1: Chromatogram směsi analytů: 1-IM; 2-BTA; 3-BA; 4-TTA; 5-SA; 6-2EHA; 7-INA; 8-PA. Separací podmínky: průtok $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, mobilní fáze methanol/voda: 10-75 %, detekce při 211 nm.

Pro zabránění frontování píků byla voda v mobilní fázi nahrazena 0,05% (v/v) roztokem kyseliny trifluoroctové ($\text{pH} = 2,2$). Z důvodu nízké hodnoty pH musela být vyměněna kolona Poroshell HPH-C18 za Poroshell 120 SB-AQ. Nová kolona je využitelná až do $\text{pH} = 1$. Má stejnou délku a velikost částic jako předešlá, změnil se pouze průměr ze 3,0 na 2,1 mm. Z tohoto důvodu bylo nutné snížit průtok na $0,35 \text{ ml min}^{-1}$.

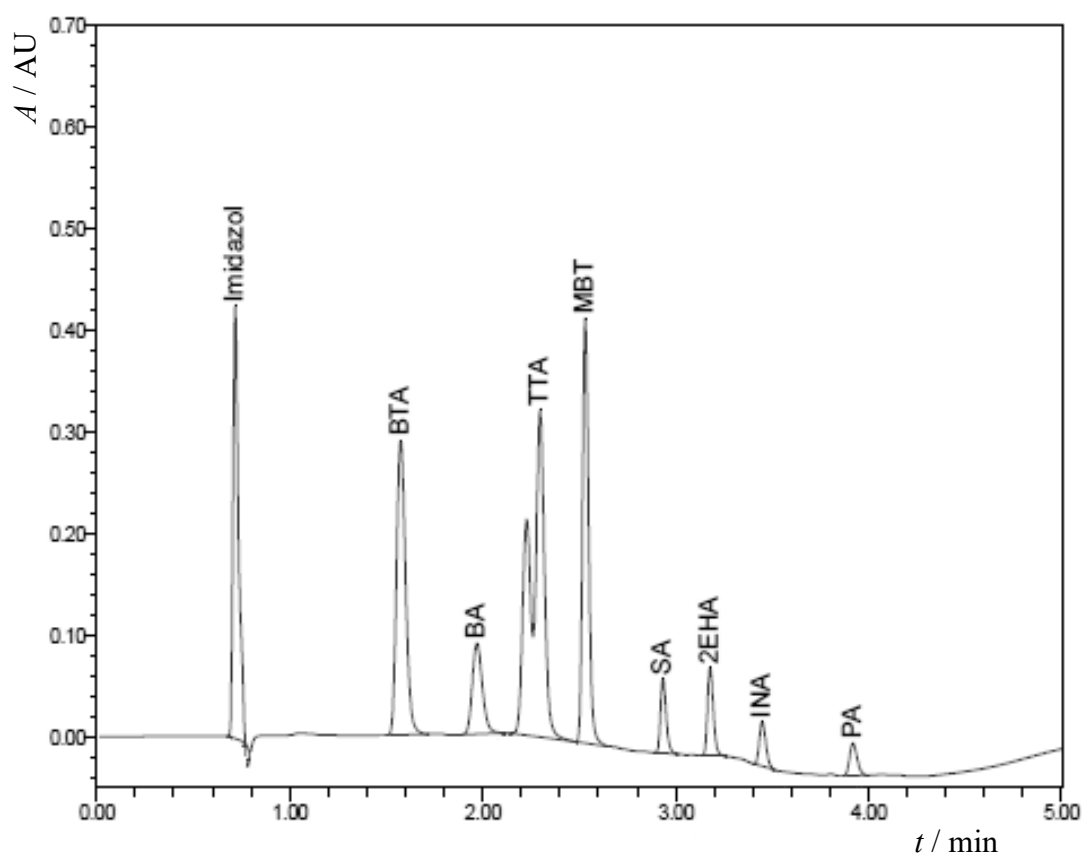
S výměnou kolony byla navíc provedena i výměna přístroje a dále bylo pracováno na přístroji Waters Acquity UPLC H Class. Detekce při 211 nm a dávkovaný objem $1 \mu\text{l}$ zůstaly nepozměněny.

Použití roztoku kyseliny trifluoroctové namísto vody zlepšilo tvar píků a umožnili pracovat v mnohem užším rozsahu koncentrací methanolu v mobilní fázi, to značně urychlilo ustálení rovnováhy kolony mezi jednotlivými měřeními, a navíc zkrátilo celkový čas analýzy. Výsledný program gradientové eluce je zaznamenán

v tabulce 5.3. Tímto programem byla analyzována směs analytů. Chromatogram je zaznamenaný na obrázku 5.2.

Tabulka 5.3: Optimalizovaný gradientový program.

t / min	$\varphi(0,05\% \text{ TFA}) / \% (\text{v/v})$	$\varphi(\text{methanol}) / \% (\text{v/v})$
0,0	60	40
0,4	60	40
1,1	35	65
2,5	35	65
3,2	60	40
5,8	60	40



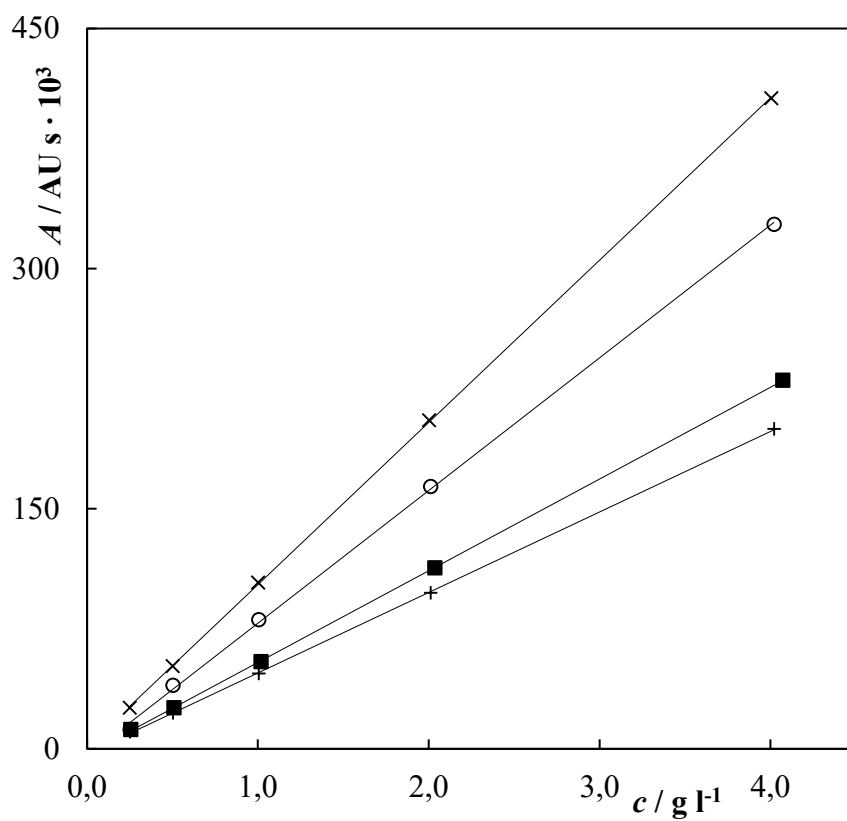
Obr. 5.2: Chromatogram směsi všech analytů při použití optimálního gradientového programu. Separační podmínky: průtok $0,35 \text{ ml min}^{-1}$, detekci při 211 nm , mobilní fáze $0,05\% (\text{v/v})$ TFA/methanol.

Na obrázku 5.2 je patrná absence původního rozmytí píků. Dále je vidět počínající separace isomerů 4-methylbenzotriazolu od 5-methylbenzotriazolu. Na separaci těchto dvou isomerů nebyl kladen důraz, jelikož pokusy ukázaly, že k úplné separaci nedojde ani při složení mobilní fáze 90:10 0,05% TFA: methanol. Navíc se při výrobě chladicích kapalin používá směs obou těchto izomerů, a proto je důležitý součet obsahu izomerů, nikoliv jejich jednotlivé zastoupení.

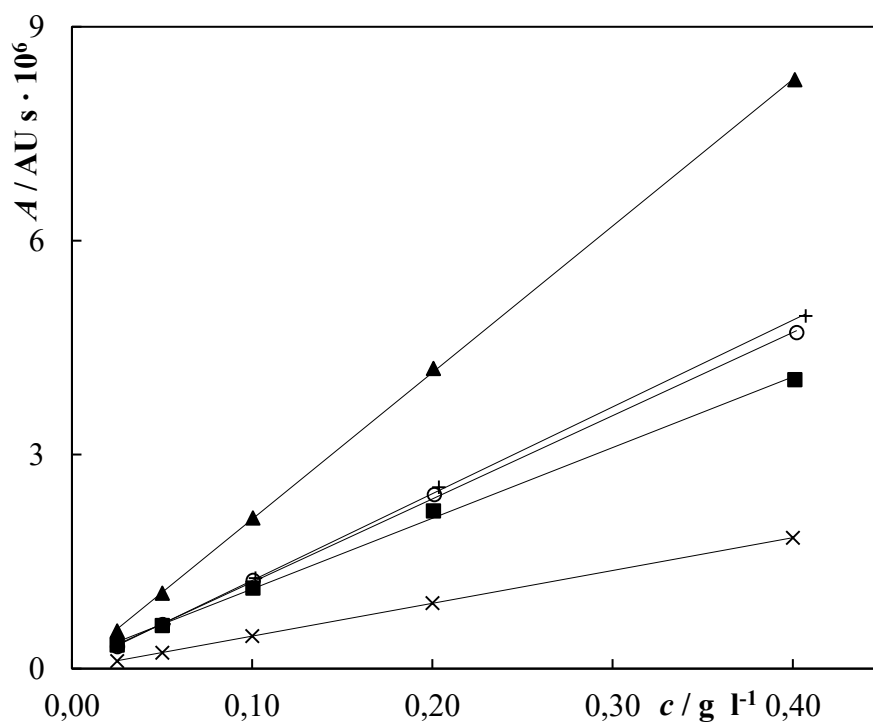
Tento eluční program byl určen za konečný a metoda byla nadále podrobena kalibraci a testům opakovatelnosti a dalších analytických parametrů, viz dále. Celková doba analýzy včetně ustálení rovnováhy v koloně činí 6,5 minuty.

5.2. Kalibrační závislosti

Kalibrace vyvinuté metody byla provedena pomocí kalibračních roztoků v pěti úrovních, každá úroveň byla měřena třikrát a ze tří naměřených ploch signálu byl vybrán medián. Závislost mediánu ploch píků jednotlivých analytů jsou zachyceny v grafech 5.1 a 5.2. V tabulkách 5.3 a 5.4 jsou shrnuty parametry příslušných kalibračních rovnic pro jednotlivé analyty.



Graf 5.1: Kalibrační přímky pro: 2EHA(×); INA(■); PA(+) a SA(o)



Graf 5.2: Kalibrační přímky pro: BA(×); IM(■); MBT(+); BTA(o) a TTA(▲)

Tabulka 5.3: Hodnoty směrnice kalibračních přímek, a , její odchylka, s_a , a relativní odchylka s_{ra} .

Analyt	$a /$ AU s g ⁻¹ l · 10 ³	$s_a /$ AU s g ⁻¹ l · 10 ³	s_{ra}
2EHA	101,3	0,4	0,37 %
INA	57,3	0,2	0,30 %
PA	50,3	0,3	0,59 %
SA	83,0	1,1	1,30 %
BA	4601,7	7,6	0,16 %
BTA	11675	125	1,07 %
TTA	20554	118	0,58 %
MBT	12169	116	0,95 %
IM	9915	225	2,27 %

Tabulka 5.4: Hodnoty posunu na ose y kalibračních přímek, b , její odchylka, s_b , a relativní odchylka s_{rb} . R^2 je pak korelační koeficient regresní přímky.

Analyt	$b /$ AU s	$s_b /$ AU s	s_{rb}	R^2
2EHA	1262	785	62 %	1,0000
INA	-3315	366	11 %	1,0000
PA	-2879	577	20 %	0,9999
SA	-4404	2244	51 %	0,9995
BA	-4429	1563	35 %	1,0000
BTA	44588	25934	58 %	0,9997
TTA	40070	24515	61 %	0,9999
MBT	19229	24307	126 %	0,9997
IM	125230	46522	37 %	0,9985

Hodnoty korelačního koeficientu R^2 , jež se příliš neliší od hodnoty 1,0000, společně s nízkými hodnotami směrodatné odchylky směrnice svědčí o dobrém provedení kalibrace. Vysoké relativní hodnoty směrodatné odchylky úseky na ose y, jsou dány velmi nízkým posunem kalibračních křivek ve směru osy y, tím se i malé vychýlení projeví vysokou relativní chybou.

5.3. Vyhodnocení analytických parametrů

5.3.1. Stanovení meze stanovitelnosti a meze detekce

Dle rovnic (4.1) a (4.2) byly spočteny hodnoty meze stanovitelnosti, LOQ , a meze detekce, LOD , pro jednotlivé analyty. Jejich hodnoty společně s hodnotami směrodatné odchylky posunu ve směru osy y a směrnici kalibrační přímky jsou uvedeny v tabulce 5.5.

Tabulka 5.5: Hodnoty LOQ a LOD pro jednotlivé analyzované látky.

Analyt	$a / \text{AU s g}^{-1} \cdot 10^3$	$s_b / \text{AU s}$	$LOQ / \text{g l}^{-1}$	$LOD / \text{g l}^{-1}$
2EHA	101,3	785	0,077	0,023
INA	57,3	366	0,064	0,019
PA	50,3	577	0,115	0,034
SA	83,0	2244	0,271	0,081
BA	4601,7	1563	0,003	0,001
BTA	11675	25934	0,022	0,007
TTA	20554	24515	0,012	0,004
MBT	12169	24307	0,020	0,006
Imidazol	9915	46522	0,047	0,014

5.3.2. Lineární dynamický rozsah

Dle popisu v oddíle 4.5.2, byl sestrojen graf a regresní přímky. Hodnoty korelačních koeficientů jsou zapsány v tabulce 5.6.

Tabulka 5.6: Korelační koeficienty

Analyt	R^2
2EHA	1,00000
INA	0,99980
PA	0,99990
SA	0,98480
BA	0,99990
BTA	0,99990
TTA	1,00000
MBT	0,99980
Imidazol	0,9997

Hodnoty korelačních koeficientů se příliš neliší od 1,0000, a proto lze tvrdit, že lineární dynamický rozsah byl potvrzen v celém rozsahu kalibrace.

5.3.3. Opakovatelnost

Z deseti naměřených hodnot ploch a retenčních časů pro látky BTA, TTA, INA a SA. Byly dle rovnic (4.4) a (4.5) dopočteny hodnoty směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek, a to jak pro plochy, tabulka 5.7, tak pro retenční časy, tabulka 5.8. Do rovnice (4.4) byla za k_n dosazena hodnota $k_{10} = 0,3249$.

Tabulka 5.7: Hodnoty průměru ploch, \bar{A} , R je rozpětí maximální a minimální hodnoty, směrodatných odchylek, s , a jejich relativních hodnot, s_r , pro analyty.

Analyt	$\bar{A} / \text{AU s} \cdot 10^3$	$R / \text{AU s} \cdot 10^3$	$s / \text{AU s} \cdot 10^3$	s_r
BTA	1229,6	13,6	4,0	0,32 %
INA	54,1	1,49	0,4	0,79 %
SA	80,7	3,25	0,8	1,01 %
TTA	2106	37,5	9,2	0,44 %

Tabulka 5.8: Hodnoty průměru retenčních časů, \bar{t} , směrodatných odchylek, s , a jejich relativních hodnot, s_r , pro analyty.

Analyt	\bar{t} / min	R / min	s / min	s_r
BTA	1,571	0,004	0,001	0,08 %
INA	3,445	0,005	0,002	0,05 %
SA	2,934	0,005	0,002	0,06 %
TTA	2,290	0,005	0,002	0,07 %

Jak je patrné z tabulky 5.7 relativní směrodatné odchylky jsou skoro vždy menší než 1 %. V tabulce 5.8 jsou relativní směrodatné odchylky v setinách procent. Lze tedy tvrdit, že vyvinutá metoda je opakovatelná jak z hlediska velikosti získaných signálů, ploch píků, tak z hlediska retenčních časů analytů.

5.3.4. Stanovení výtěžnosti metody

Výtěžnost, R_f , byla stanovena pro 2EHA, BA, BTA, INA, PA, SA a TTA, které byly zastoupeny ve čtyřech vzorcích v různých koncentracích převážně ve formě sodných solí. Naměřené a referenční koncentrace jsou společně s hodnotami výtěžnosti uvedeny v tabulce 5.9.

Tabulka 5.9: Hodnoty naměřených koncentrací c_{obs} , skutečných c_{ref} a výtěžnosti R_f .

	Analyt	$c_{\text{obs}} / \text{g l}^{-1}$	$c_{\text{ref}} / \text{g l}^{-1}$	R_f
vzorek 1	2EHA	1,031	1,002	103 %
	SA	0,511	0,486	105 %
	TTA	0,268	0,251	107 %
vzorek 2	2EHA	1,015	1,013	100 %
	SA	0,503	0,481	105 %
	BTA	0,269	0,258	104 %
vzorek 3	2EHA	0,995	1,008	99 %
	INA	0,629	0,635	99 %
	TTA	0,124	0,121	103 %
	BTA	0,126	0,126	100 %
vzorek 4	PA	1,031	1,045	99 %
	BA	0,401	0,401	100 %
	TTA	0,154	0,147	105 %
	BTA	0,114	0,107	107 %

Z tabulky 5.8 je patrné, že hodnoty výtěžnosti se nejčastěji pohybují v intervalu 95–105 % a pouze z 1/7 v intervalu 90–110 %. Je tedy možné tvrdit, že výtěžnost metody pro analýzu chladicích kapalin je uspokojivá a metodu lze použít i ke stanovení analytů ve formě jejich solí.

5.4. Aplikace metody na analýzu reálných chladicích kapalin

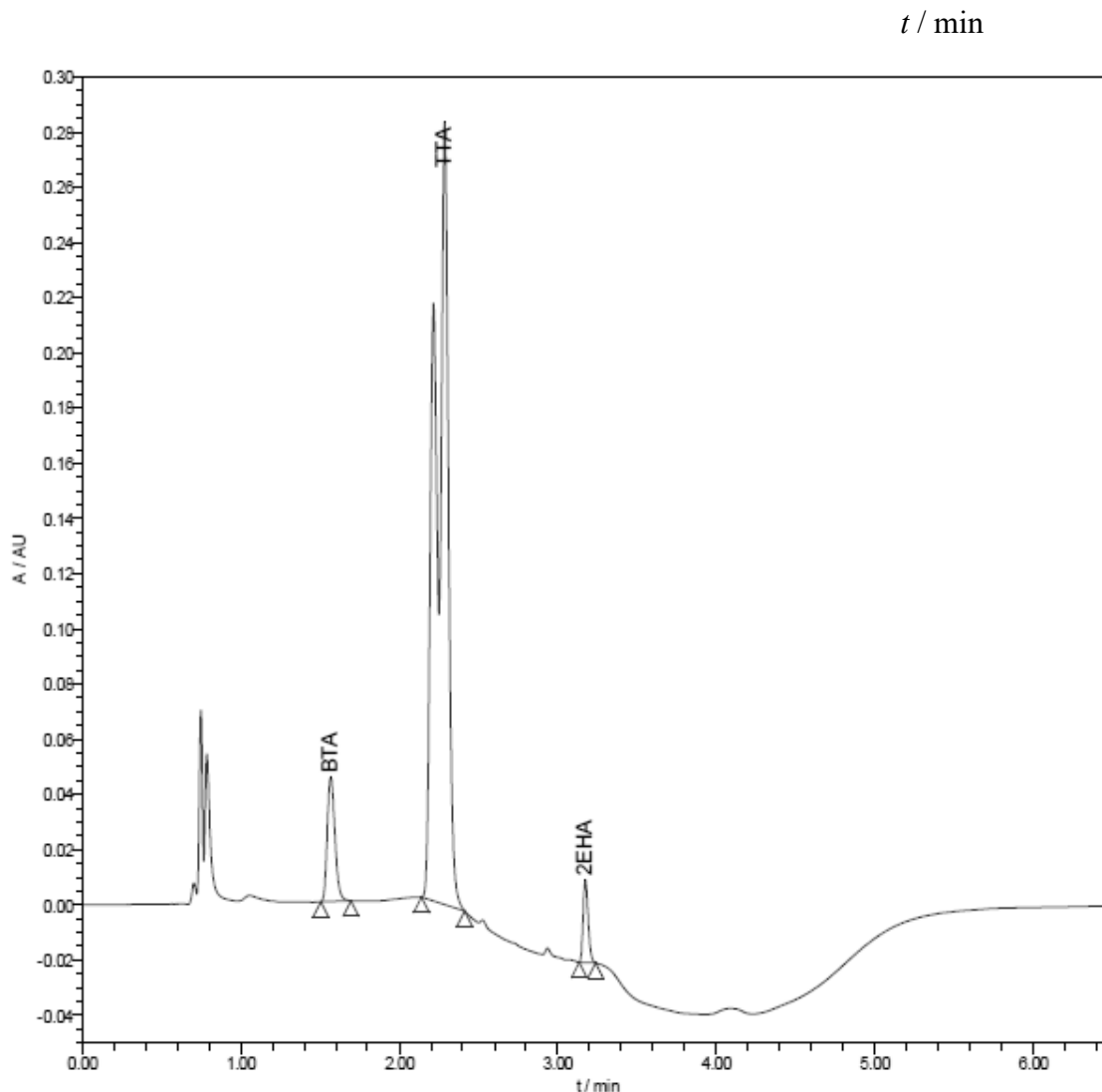
Vzhledem k pozitivním výsledkům z hlediska výtěžnosti, LOQ, LOD a lineárního dynamického rozsahu mohla být vyvinutá metoda aplikována na analýzu komerčně vyráběných chladicích kapalin. Pro úplnost však bylo nutné ještě vyzkoušet, zda separaci neovlivní používané anorganické inhibitory, a hlavně používané barvy, které slouží k vizuálnímu rozlišení směsí.

Z výše zmíněných důvodů byly připraveny chladicí kapaliny, jež obsahovaly vždy pouze jednu z těchto anorganických složek: dusičnan sodný, křemičitan sodný a borax. Tyto nemrznoucí směsi byly naředěny methanolem na koncentraci 50 g l^{-1} .

Nejprve byla vyzkoušena mísitelnost s mobilní fází a následně byly analyzovány vzorky. Získané chromatogramy nevykazovaly ani v jednom případě zhoršení separace, či jiné narušení vyvinuté metody.

Testování odolnosti metody vůči používaným barvám bylo testováno na barvivech vyráběných společností Keystone, UK. Konkrétně pak na Rhodamin™ WT, Keyacid™ Green G-AF, Keyacid™ Blue BL a Keyacid™ Fluorescien. Všechna použitá barviva jsou směsí organických barviv, jejich přesné složení je však kryto výrobním tajemstvím společnosti Keystone. Proto byly připraveny čtyři stejné směsi, jež byly postupně obarveny jednotlivými barvami dle instrukcí výrobce a následně naředěny methanolem na 50 g l^{-1} , poté pak analyzovány. Vzhledem k nízké koncentraci barev již ve směsi před naředěním methanolem, řádově tisíce hmotnostních procent, byly získané signály velmi slabé či dokonce žádné, jelikož Keyacid™ Green G-AF a Keyacid™ Blue BL mají při vlnové délce 211 nm velmi nízkou absorpční hodnotu. Pro zjištění retenčních časů daných barev byla vlnová délka detektoru upravena na hodnotu absorpčního maxima dané barvy. Následně bylo prokázáno, že jejich složky elulují v jiných časech než analyty a tím nedochází k narušení separace.

Po provedení výše zmíněných testů bylo přistoupeno k analýze reálné chladicí kapaliny. Pro tento účel byl vybrán vzorek chladicí kapaliny společnosti Classic Oil, s.r.o. (ČR) s názvem CS Antifreeze G® 12+. Vybraný vzorek představuje chladicí kapalinu s obsahem organických inhibitorů na bázi technologie OAT. Nemrznoucí směs byla naředěna methanolem na koncentraci $50,03 \text{ g l}^{-1}$ a následně analyzována vyvinutou metodou. Záznam měření je na obrázku 5.3.



Obr. 5.3: Chromatogram vzorku CS Antifreeze G[®] 12+. Separální podmínky: průtok 0,35 ml min⁻¹, detekcí při 211 nm, mobilní fáze 0,05% (v/v) TFA/methanol, koncentrace methanolu 40-65 % (v/v).

Byla zjištěna přítomnost tří inhibitorů koroze a to BTA, TTA, EHA v koncentracích: < 0,025; 0,074 a 0,631 g l⁻¹. Koncentrace BTA ve vybraném vzorku byla bohužel nižší než nejnižší bod kalibrační přímky tohoto analytu, proto nemohla být určena přesněji. Pro jeho přesné stanovení by bylo nutné vzorek na počátku naředit na vyšší koncentrací, než byla doporučena. Další řešení pro vytvoření mnohem robustnější metody, je přidání další kalibrační úrovně dvakrát ředěnější oproti stávající nejnižší. Tím bude metoda mnohem vhodnější pro automatizaci a standardizaci.

6. Závěr

Pomocí UHPLC a kolony s tuhým jádrem byla vyvinuta metoda pro stanovení vybraných organických inhibitorů koroze, a to jak v jejich vzájemné směsi, tak i v komerčně dostupné chladicí kapalině.

Optimalizovaná metoda spočívá v použití kolony PoroShell 120 SB-AQ od společnosti Agilent Technologies, mobilní fáze sestávající z methanolu a vodného roztoku kyseliny trifluoroctové o koncentraci 0,05 % (v/v). Průtok kolonou činní 0,35 ml min⁻¹. Nástrík je o objemu 1 µl vzorku chladicí kapaliny nejčastěji ředěného na koncentraci 50 g l⁻¹ v methanolu, je však možné použít i vyšší koncentrace v závislosti na koncentraci analytů ve vzorku. Detekce látek byla prováděna při vlnové délce 211 nm. Celé měření bylo prováděno při 25 °C a doba jedné analýzy činila 6,5 min.

Vyvinutá metoda byla kalibrována v rozmezí koncentrací 0,25 až 4,0 g l⁻¹ pro 2EHA, INA, PA a SA. Kalibrace pro zbylé látky BA, BTA, TTA, MBT a IM byla provedena v koncentracích 0,025 až 0,400 g l⁻¹.

Pro danou metodu byla ověřena opakovatelnost, její relativní směrodatná odchylka byla pro plochy píků menší než 1 % a pro retenční časy se její hodnota pohybovala v setinách procent. Dále byly určeny meze detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé látky. Hodnoty *LOQ* se pohybovaly pod 280 mg l⁻¹ a *LOD* pod 90 mg l⁻¹. Lineární dynamický rozsah detektoru zahrnoval jak nejnížší, tak nejvyšší vybranou kalibrační koncentraci pro všechny látky.

Na závěr byla pomocí vyvinuté metody analyzována reálná chladicí kapalina společnosti Classic Oil s názvem CS Antifreeze G[®] 12+. Ve vzorku naředěném v methanolu o koncentraci 50,01 g l⁻¹ byly stanoveny tyto látky: 2EHA, BTA a TTA v koncentracích 0,631; <0,025 a 0,074 g l⁻¹.

7. Použitá literatura

- [1] International, ASTM, „Committee D15 on Engine Coolants and Related Fluids,“ [Online]. Available: <https://www.astm.org/COMMITTEE/D15.htm>. [Přístup získán 1. 4. 2017].
- [2] SciFinder, „scifinder.cas.org,“ [Online]. [Přístup získán 10. 5. 2017].
- [3] E. Manzano, L. Rodríquez-Simón, N. Navas, R. Checa-Moreno, M. Romero-Gómez a L. Capitan-Vallvey, „Study of the GC–MS determination of the palmitic–stearic acid ratio for the characterisation of drying oil in painting: La Encarnación by Alonso Cano as a case study,“ *Talanta*, č. 84, pp. 1148-1154, 2011.
- [4] M. Jemal a Z. Ouyang, „Gas chromatography mass spectrometric method for quantitative determination in human urine of dicarboxylic (dioic) acids produced in the body as a consequence of cholesterol biosynthesis inhibition,“ *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B*, sv. 2, č. 709, pp. 233-241, 1998.
- [5] S. Han, K. Kozłowicz-Bodalska, P. Potaczek, A. Wójcik, Ł. Ozimek, D. Szura a W. Misiał, „Identification of Unknown Impurity of Azelaic Acid in Liposomal Formulation Assessed by HPLC-ELSD, GC-FID and GC-MS,“ *PharmSciTech*, Vol 15, No. 1, pp. 111-120, 2. 2014.
- [6] M. M. Kusnir, G. Komaromy-Hiller, B. Shushan, F. M. Urry a W. L. Roberts, „Analysis of Dicarboxylic Acids by Tandem Mass Spectrometry. High-Throughput Quantitative Measurement of Methylmalonic Acid in Serum, Plasma, and Urine,“ *Clinical Chemistry* 47, pp. 1993-2002, 2011.
- [7] H. Miwa, „High-performance liquid chromatographic determination of mono-, poly- and hydroxycarboxylic acids in foods and beverages as their 2-nitrophenylhydrazides,“ *Journal of Chromatography A*, 881, pp. 365-385, 2000.
- [8] H. Wolschke, Z. Xie, A. Möller, R. Sturn a R. Ebinghaus, „Occurrence, distribution and fluxes of benzotriazoles along the German large river basins into the North Sea,“ *Water Research* 45, pp. 6259-6266, 2011.
- [9] K. McNiell a D. Cancilla, „Detection of Triazole Deicing Additives in Soil Samples from Airports with Low, Medium and Large Volume Aircraft Deicing Activities,“ *Bull Environ Contam Toxicol* 82, pp. 265-269, 2009.
- [10] X. Quan a L. Lang, „Application Note: 204; An Improved Method for Determination of Corrosion Inhibitors in Engine Coolant,“ Thermo Scientific.

- [11] „HPLC.cz,“ [Online]. Available: <http://hplc.cz/>. [Přístup získán 15. 4. 2017].
- [12] Chromsevis, [Online]. Available: <https://www.chromservis.eu>. [Přístup získán 15. 4. 2017].
- [13] Agilent Technologies, [Online]. Available: <http://www.agilent.com>. [Přístup získán 15. 4. 2017].
- [14] T. H. Walter a R. W. Andrews, „Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation,“ *Trend in Analytical Chemistry* 63, pp. 14-20, 2014.
- [15] Phenomenex, „Phenomenex: Core Shell Technology,“ [Online]. Available: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>. [Přístup získán 17. 4. 2017].
- [16] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge a H. Zhang, „Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography,“ *Journal of Chromatography A*, 1357, pp. 36-52, 2014.
- [17] A. Shrivastava a V. B. Gupta, „Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods,“ *Chronicles of Young Scientists*, Modhya Pradesh, 2011.